

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2014.05.018

• 临床研究 •

环氧合酶-2对人SGC-7901胃癌细胞E-cadherin的表达及迁移能力的影响



刘 敏, 陈兆峰, 李玲玲, 周永宁

Effects of Cyclooxygenase-2 on E-cadherin Expression and Migration of Human Gastric Carcinoma Cell Line SGC-7901 *in vitro*

LIU Min, CHEN Zhaofeng, LI Lingling, ZHOU Yongning

Department of Gastroenterology, The First Hospital Affiliated Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

Corresponding Author: ZHOU Yongning, E-mail: yongningzhou@sina.com.cn

Abstract: Objective To investigate the effects of cyclooxygenase-2(COX-2) regulating E-cadherin expression on migration capability of gastric carcinoma cell line SGC-7901. **Methods** After SGC-7901 cell line treated by Celecoxib and PGE₂ *in vitro*, real-time quantitative PCR was used to detect the changes of mRNA levels of COX-2 and E-cadherin. The combination of immunofluorescence and Confocal laser scanning microscopy was used to analyze the protein level of E-cadherin. Transwell was used to detect the change of cell migration. **Results** COX-2 mRNA expression was inhibited by Celecoxib, but E-cadherin mRNA expression level was increased significantly with decreased COX-2 expression, in a dose- and time-dependent manner($P<0.01$). On the contrary, E-cadherin mRNA expression level was decreased in a time- and dose-dependent manner after PGE₂ treatment($P<0.05$ or $P<0.01$). After SGC-7901 cell line were treated with Celecoxib (30 $\mu\text{mol/L}$) for 24,36,48 h, E-cadherin protein level was increased significantly($P<0.05$), while E-cadherin protein expression was significantly decreased after PGE₂ treatment(1 $\mu\text{mol/L}$) for 24 and 48 h ($P<0.05$). The cell numbers through Transwell with Celecoxib treatment was less than that of no-treatment group($P<0.01$). While, the cell numbers through Transwell with PGE₂ treatment was more than that of no-treatment group ($P<0.05$). **Conclusion** Celecoxib, selective COX-2 inhibitor, may upregulate E-cadherin expression and inhibit the invasive potential of human gastric carcinoma by suppressing COX-2 expression. PGE₂ may downregulate E-cadherin expression and promote the migration of SGC-7901 *in vitro*.

Key words: COX-2; E-cadherin; Celecoxib; PGE₂; Migration; Gastric carcinoma

摘 要: **目的** 研究环氧合酶-2 (COX-2) 通过调控E-钙黏素 (E-cadherin) 对胃癌细胞侵袭迁移能力的影响。 **方法** 分别应用塞来昔布 (Celecoxib) 及前列腺素E₂(PGE₂)对体外培养的人胃癌细胞SGC-7901进行干预, 采用实时荧光定量反转录PCR检测COX-2、E-cadherin mRNA的表达; 运用免疫荧光标记法结合激光共聚焦荧光显微镜分析E-cadherin的蛋白表达量; 应用Transwell法检测细胞迁移能力的变化。 **结果** 实时荧光定量反转录PCR检测塞来昔布明显抑制体外培养人胃癌细胞SGC-7901中COX-2 mRNA的表达 ($P<0.01$), 而E-cadherin mRNA的表达随着COX-2的表达下降而呈浓度与时间依赖性升高 ($P<0.01$); 运用PGE₂干预后E-cadherin mRNA表达呈浓度与时间依赖性下降 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。塞来昔布30 $\mu\text{mol/L}$ 干预人胃癌细胞SGC-7901 24、36、48 h后, 激光共聚焦荧光显微镜检测E-cadherin的蛋白表达量明显升高 ($P<0.05$); PGE₂ 1 $\mu\text{mol/L}$ 干预24、48 h后, E-cadherin蛋白表达量明显下降 ($P<0.05$)。塞来昔布组穿过Transwell小室的细胞数明显少于对照组 ($P<0.01$), PGE₂组穿过Transwell小室的细胞数明显高于对照组 ($P<0.05$)。 **结论** COX-2特异性抑制塞来昔布通过抑制COX-2的表达, 上调E-cadherin表达量, 抑制体外培养人胃癌细胞SGC-7901的迁移能力; 外源性PGE₂能够下调SGC-7901胃癌细胞E-cadherin表达量从而促进肿瘤细胞的迁移能力。

关键词: 环氧合酶-2; E-钙黏素; 塞来昔布; 前列腺素E₂; 迁移; 胃癌

中图分类号: R735.2 文献标识码: A

收稿日期: 2013-03-18; 修回日期: 2013-07-02
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81172366); 甘肃卫生行业科研计划资助项目 (GSWT09-03); 兰州大学中央高校基本科研业务费专项资金 (lzujbky-2013-253)
作者单位: 730000 兰州, 兰州大学第一医院消化内科
通信作者: 周永宁, E-mail: yongningzhou@sina.com.cn
作者简介: 刘敏 (1982-), 女, 博士在读, 主要从事消化系统肿瘤临床研究

0 引言

胃癌是全球高发的恶性肿瘤之一, 2008年全球新发胃癌患者989 600例, 占有新发癌症病例的8%, 死亡738 000例, 占有死亡病例的10%^[1]。E-钙黏素 (E-cadherin) 在细胞-细胞黏

附中起重要作用，其编码基因的胚系突变失活与散发家族性胃癌有关；大量研究使E-cadherin在肿瘤形成的早期阶段的作用得到公认，除此之外E-cadherin在肿瘤进展、侵袭迁移及代谢方面均起着非常关键的作用^[2]。环氧合酶-2（COX-2）是一种诱导型表达蛋白，催化花生四烯酸生成前列腺素，参与炎症、肿瘤血管形成及肿瘤侵袭转移等多种病理生理过程^[3]。研究表明，COX-2在散发型胃癌的原发灶及其转移淋巴结中均有表达，且后者的表达明显升高，提示COX-2与肿瘤转移有关^[4]。流行病学数据显示，服用非甾体类消炎药与胃癌患病风险降低有关；而选择性COX-2抑制剂不仅可以降低健康人群罹患胃癌的风险，且具有较小的胃肠道及心血管不良反应适于胃癌高危人群的一级预防，但非甾体类消炎药化学防癌的分子机制尚未完全阐述清楚^[5]。本实验通过以不同剂量的选择性COX-2抑制剂塞来昔布（Celecoxib）和外源性PGE₂对人胃癌细胞株SGC-7901进行干预，研究COX-2对人胃癌细胞SGC-7901中E-cadherin表达及迁移能力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

SGC-7901人胃癌细胞购于中国科学院上海生命科学研究院。塞来昔布与PGE₂纯品由香港大学医学院馈赠。新生牛血清和胎牛血清均购于杭州四季青公司，RPMI 1640购于美国Gibco公司，Transwell小室购于美国Millipore公司。E-cadherin兔抗人抗体和FITC标记羊抗兔抗体购于美国Bioworld公司。ZE Spin Colum Total RNA Isolation Kit、PrimeScript™ RT Reagent kit、SYBP®Premix Ex Taq™均购于日本TaKaRa公司。

1.2 实时荧光定量RT-PCR检测COX-2、E-cadherin的表达

常规培养细胞并加入药物干预，按照柱式提取试剂盒说明提取RNA，反转录为cDNA，以cDNA为模板进行PCR反应，人COX-2基因片段扩增引物序列为：F：5'- TGGTGCCTGGTCTGA TGATGTATGC -3'，R：5'- ATCTGCCTGCTCTG GTCAATGGAAG -3'，扩增片段长度为125 bp。人E-cadherin基因片段扩增引物序列为：F：5'- TTAAACTCCTGGCCTCAAGCAATC -3'，R：5'- TCCTATCTTGGGCAAAGCAACTG -3'，扩增片段长度为108 bp。PCR反应体系SYBP®Premix Ex Taq™ 12.5 μl，cDNA模板2 μl，引物各1 μl，ddH₂O

8.5 μl。反应条件：95℃、30 s；95℃、5 s；62℃、30 s；40个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 公式计算目的基因相对表达量。实验重复四次取平均值进行统计学分析。

1.3 细胞免疫荧光标记法结合荧光共聚焦显微镜检测E-cadherin蛋白表达

常规培养细胞进行爬片，分别以塞来昔布30 μmol/L处理0、24、36、48、60、72h和PGE₂ 1 μmol/L处理0、12、24、48 h后取出盖玻片，冰丙酮:甲醇(1:1)固定10 min，10 g/L BSA封闭30 min，加入一抗（1：100）4℃孵育过夜，PBS洗涤并加入二抗（1：200）37℃暗盒孵育2 h后封片，以PBS替代一抗作为阴性对照。激光共聚焦荧光显微镜下扫描，每高倍视野随机选取3个肿瘤细胞，利用Leica confocal software软件计算荧光强度，实验重复3次取平均值。

1.4 Transwell小室法检测肿瘤细胞体外迁移能力

制作单细胞悬液（5×10⁵/ml），30 μmol/L塞来昔布或1 μmol/L PGE₂加入单细胞悬液并混匀。上室中加入200 μl药物与细胞的混悬液，下室加入600 μl含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液作为趋化力，继续培养24 h后取出小室，拭去小室滤膜上表面未穿出的细胞，瑞士染液染色20 min，倒置显微镜200倍镜下分别选取滤膜下表面上、下、左、右、中心5个视野计数，其平均细胞数进行统计分析，各组设3个复孔。

1.5 统计学方法

计量资料结果以均数±标准差（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，采用SPSS16.0统计软件进行统计学处理，多个样本均数的比较采用单因素方差分析，两样本均数的比较采用两独立样本t检验，两变量之间的相关性检验用Spearman相关分析。以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实时荧光定量RT-PCR检测COX-2、E-cadherin mRNA的表达量及相关性分析

塞来昔布按照10、20、30、40、50 μmol/L干预SGC-7901细胞24 h后，COX-2 mRNA的表达量与0 μmol/L组相比明显降低，其中20、30、40、50 μmol/L浓度组与0 μmol/L组相比差异具有统计学意义（P<0.01）；而E-cadherin mRNA的表达量则呈逐渐升高趋势，30、40 μmol/L两个浓度组E-cadherin mRNA的表达量与0 μmol/L组相比差异有统计学意义（P<0.01），且呈浓度依赖性增高，见表1。塞来昔布30 μmol/L浓度处理SGC-7901胃癌细胞12、24、36、48 h后，COX-2 mRNA的相

对表达量降低,与0 h比差异有统计学意义 ($P<0.01$);相反的, E-cadherin mRNA的相对表达量逐渐升高, 36、48 h与0 h组相比差异有统计学意义 ($P<0.01$), 见表2。PGE₂按照0.1、1、5、10 μmol/L的浓度干预SGC-7901细胞24 h, E-cadherin mRNA表达量逐渐下降, 分别为(0.68±0.02)、(0.48±0.007)、(0.24±0.03)、(0.30±0.01), 与0 μmol/L (1.00±0.00)相比差异具有统计学意义 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。给予PGE₂ 1 μmol/L浓度处理后, 12、24、48 h E-cadherin mRNA表达量依次为(0.65±0.03)、(0.54±0.11)、(0.57±0.13)与0 h组(1.00±0.00)相比明显降低, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。采用曲线拟合描述COX-2与E-cadherin mRNA表达的关系并进行差异性检验 ($P=0.04$), 说明COX-2与E-cadherin mRNA表达之间呈负相关关系。

2.2 免疫荧光标记法结合激光共聚焦荧光显微镜检测E-cadherin蛋白的表达量

塞来昔布30 μmol/L作用24、36、48 h后E-cadherin平均荧光强度分别为(23.94±5.66)、(53.14±11.49)、(21.23±7.65), E-cadherin蛋白的表达量明显增加, 与对照组(14.54±3.13)相比差异均有统计学意义 ($P<0.05$), 见图1。PGE₂ 1 μmol/L处理SGC-7901细胞 24、48 h后, E-cadherin的平均荧光强度值分别为(16.1±0.43)、(10.3±0.8), 其表达量明显降低, 与对照组(29.11±0.41)相比差异均有统计学意义 ($P<0.05$), 见图2。

2.3 Transwell小室法检测肿瘤细胞体外迁移能力

以30 μmol/L的塞来昔布作用于SGC-7901胃癌细胞24 h后, 计算穿膜细胞数为(15±5.9)个/高倍视野, 比对照组(75±12.3)个/高倍视野明显减少, 差异有统计学意义 ($t=16.196, P=0.000$)。以1 μmol/L的PGE₂作用于体外培养的SGC-7901胃癌细胞24 h后, 计算

穿膜细胞数为(120±16.78)个/高倍视野, 比对照组(75±12.3)个/高倍视野明显增加, 差异有统计学意义 ($t=-3.575, P=0.005$)。

3 讨论

胃癌是全球高发的恶性肿瘤之一, 在中国每年新增约36~40万胃癌患者, 死亡率占据我国肿瘤死因的第二位^[6]。转移是恶性肿瘤最具破坏性的特征, 亦是导致恶性肿瘤死亡的首要因素, 大量研究证实, 环氧合酶2 (COX-2) 在恶性肿瘤的发生发展进程中发挥着重要的作用, 因而其与恶性肿瘤的关系倍受关注。目前认为, COX-2主要通过催化花生四烯酸使前列腺素E2 (PGE₂) 产生增加而参与恶性肿瘤的发生发展、侵袭转移^[7]。E-cadherin是钙黏素家族的主要成员, 在细胞-细胞黏附中起重要作用, 其功能缺失将破坏上皮细胞-细胞黏附功能, 改变基质间的相互作用, 转变细胞迁移及信号使其具有癌细胞特征^[2]。研究显示, 肿瘤进展阶段常伴有E-cadherin功能的缺失, 使癌细胞具有向临近组织侵袭及向远处转移的能力^[8]。

大量研究发现COX-2与E-cadherin在消化道肿瘤中存在调控关系。Bocca等^[9]发现, 罗非昔布能够上调结肠癌细胞膜β-catenin/E-cadherin的表达并抑制细胞增殖。Shar等^[10]使用塞来昔布对29例Barrett's 食管癌患者进行二级预防, 随访一年后发现与未干预组相比, 干预组患者Barrett's 食管癌明显好转, 其分子标志物E-cadherin表达较对照组升高。本研究显示: 在体外实验中, 塞来昔布特异性抑制了SGC-7901胃癌细胞中COX-2的表达, E-cadherin 表达量随着COX-2 表达下降呈剂量和时间依赖性增高并出现明显的胞膜聚集现象,

表1 不同浓度塞来昔布处理SGC-7901细胞24 h后COX-2与E-cadherin mRNA表达的变化 ($\bar{x}\pm s, n=4$)

Table1 Expressions of COX-2 and E-cadherin mRNA in SGC-7901 after treatment with different concentrations of Celecoxib for 24 h ($\bar{x}\pm s, n=4$)

Genes	Celecoxib concentrations(μmol/L)					
	0	10	20	30	40	50
COX-2	1.00±0.00	1.00±0.12	0.78±0.14 [■]	0.64±0.10 [■]	0.51±0.80 [■]	0.37±0.10 [■]
E-cadherin	1.00±0.00	0.78±0.19	1.43±0.37	2.83±0.14 [▲]	2.52±0.45 [▲]	1.45±0.40

Notes: [■] and [▲]: $P<0.01$, compared with 0 μmol/L, When Celecoxib reached to 50 μmol/L, it could inhibit cells growth dramitically, which could decrease E-cadherin expression too

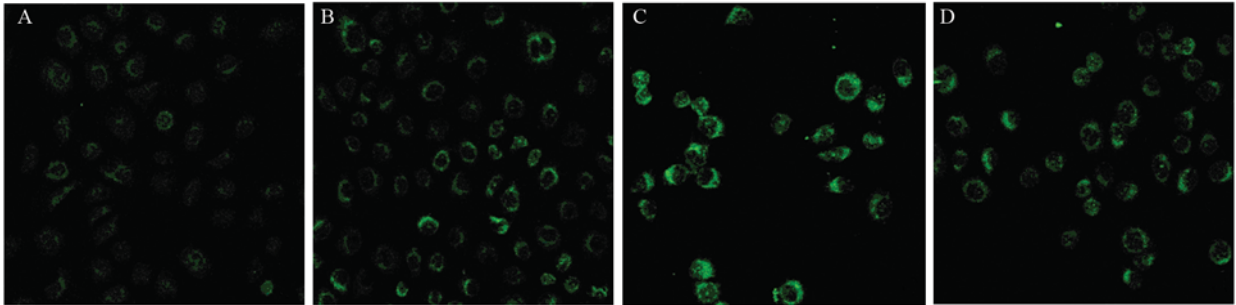
表2 30 μmol/L塞来昔布处理SGC-7901细胞不同时间COX-2与E-cadherin mRNA表达的变化 ($\bar{x}\pm s, n=4$)

Table2 Expressions of COX-2 and E-cadherin mRNA in SGC-7901 treated with 30 μmol/L Celecoxib for different time

($\bar{x}\pm s, n=4$)

Genes	Time (h)						
	0	12	24	36	48	60	72
COX-2	1.00±0.00	0.47±0.18 [■]	0.61±0.10 [■]	0.65±0.70 [■]	0.69±0.02 [■]	0.95±0.09	1.17±0.21
E-cadherin	1.00±0.00	0.78±0.23	2.85±0.40	5.04±1.74 [▲]	4.15±1.22 [▲]	1.18±0.72	0.51±0.19

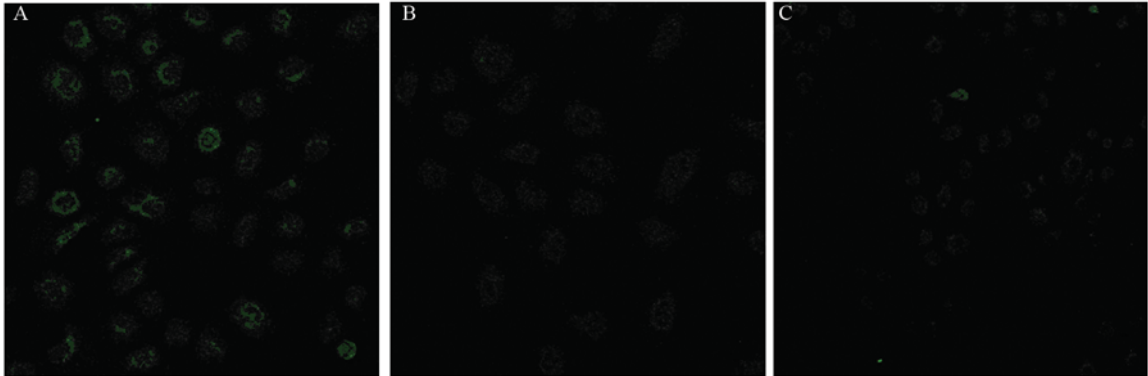
Notes: [■] and [▲]: $P<0.01$, compared with 0 h



A:control;B,C and D:fluorescence intensity of E-cadherin after treatment with Celecoxib for 24, 36 and 48 h

图1 塞来昔布30 μmol/L处理SGC-7901细胞不同时间后E-cadherin蛋白表达的变化

Figure1 E-cadherin protein expression in SGC-7901 treated with 30 μmol/L celecoxib for different time



A:control; B and C: fluorescence intensity of E-cadherin after treatment with PGE₂ for 24 and 48 h

图2 PGE₂ 1μmol/L处理SGC-7901细胞不同时间E-cadherin蛋白表达的变化

Figure2 E-cadherin protein expression in SGC-7901 after treated with 1 μmol/L PGE₂ for different time

而肿瘤细胞迁移数量明显下降；另一方面，在加入COX-2催化产物PGE₂后E-cadherin表达明显下调，肿瘤细胞迁移数量明显增加；统计学分析发现COX-2与E-cadherin的表达水平呈负相关关系。与我们的研究相似，Sitarz等^[11]研究发现，COX-2在传统的胃癌细胞系中上调E-cadherin转录及蛋白的表达，在早发性胃癌细胞株中下调E-cadherin的表达。上述结果均提示在SGC-7901细胞系中E-cadherin的表达可能受COX-2的调控，COX-2抑制剂的化学防癌机制可能与上调E-cadherin的表达并进一步抑制肿瘤细胞迁移有关。但胃癌细胞中COX-2调控E-cadherin 表达的信号转导通路尚需进一步实验进行阐明。

本研究结果显示在体外实验中塞来昔布能够抑制胃癌侵袭迁移并上调E-cadherin的表达；而加入外源性的PGE₂后促进胃癌细胞迁移并使E-cadherin的表达下调。上述结果表明COX-2可能通过调控E-cadherin参与肿瘤转移过程，提示非甾体类消炎药（NSAIDs）的化学防癌机制可能与抑制肿瘤细胞的迁移有关，为临床治疗胃癌提供了新的思路和靶点。

参考文献:

[1] Jemal A, Bray F, Center MM,et al. Global cancer statistics[J]. CA

Cancer J Clin,2011,61(2): 69-90.

[2] Carneiro P,Fernandes MS,Figueiredo J,et al.E-cadherin dysfunction in gastric cancer-cellular consequences, clinical applications and open questions[J]. FEBS Lett,2012,586(18): 2981-9.

[3] Zheng X.The recent development of the relationship between cyclooxygenase-2 and gastric cancer[J].Xi Nan Jun Yi,2012,14(3):493-6.[郑旭.环氧化酶2（COX-2）与胃癌关系的研究进展[J].西南军医,2012,14(3):493-6.]

[4] Almeida PR, Ferreira FV, Santos CC,et al.Immunoexpression of cyclooxygenase-2 in primary gastric carcinomas and lymph node metastases[J].World J Gastroenterol,2012,18(8): 778-84.

[5] Ford AC.Chemoprevention for gastric cancer[J].Best Pract Res Clin Gastroenterol,2011,25(4-5): 581-92.

[6] KeXiang Z, YuMin L, Xun L,et al.Study on the association of COX-2 genetic polymorphisms with risk of gastric cancer in high incidence Hexi area of Gansu province in China[J].Mol Biol Rep,2011,38(1): 649-55.

[7] Thiel A, Mrena J,Ristimäki A.Cyclooxygenase-2 and gastric cancer[J].Cancer Metastasis Rev,2011,30(3-4): 387-95.

[8] Corso G, Marrelli D, Roviello F. Familial gastric cancer and germline mutations of E-cadherin[J]. Ann Ital Chir, 2012,83(3): 177-82.

[9] Bocca C, Bozzo F, Ievolella M,et al.A novel nitro-oxy substituted analogue of rofecoxib reduces human colon cancer cell growth[J]. Mol Cell Biochem, 2012,361(1-2): 105-10.

[10] Shar AO, Gaudard MA, Heath EI,et al.Modeling using baseline characteristics in a small multicenter clinical trial for Barrett's esophagus[J]. Contemp Clin Trials,2009,30(1): 2-7.

[11] Sitarz R, Leguit RJ,de Leng WW,et al.Cyclooxygenase-2 mediated regulation of E-cadherin occurs in conventional but not early-onset gastric cancer cell lines[J].Cell Oncol,2009,31(6): 475-85.

[编辑：黄园玲；校对：杨 卉]